

**Versuche zur Frostkonservierung
des Ebersamens**

HANS HERBERT HOFFMANN

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. W. B a i e r

Versuche zur Frostkonservierung des Ebersamens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität
München

von

HANS HERBERT HOFFMANN

aus Dessau

Tierarzt

München 1959



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. Karl Zipf

Referent: Professor Dr. W. Baier

Tag der Promotion: 28. Juli 1959

Versuche zur Frostkonservierung des Ebersamens

INHALT:

Einleitung	5
-------------------	---

Literatur	5
------------------	---

Samengewinnung	5
----------------	---

Ebersamen	7
-----------	---

Konservierung von Ebersperma	8
------------------------------	---

a) Pufferung	10
--------------	----

b) Tiefkühlung	11
----------------	----

Eigene Untersuchungen	13
------------------------------	----

Samengewinnung	13
----------------	----

Untersuchung des Ejakulates	15
-----------------------------	----

Austestung der Puffer	17
-----------------------	----

Tiefkühlung	24
-------------	----

a) Glycerinverträglichkeit	25
----------------------------	----

b) Technik der Tiefkühlung	27
----------------------------	----

Zusammenfassung	37
------------------------	----

Literatur-Verzeichnis	39
------------------------------	----

Lebenslauf	43
-------------------	----

Die Methodik der Tiefkühlung von Ebersperma.

Einleitung

Die Tiefkühlung von Sperma hat weitgehende Verbreitung in der künstlichen Besamung des Rindes gefunden. Eine erfolgreiche Tiefkühlung von Schweinesperma ist bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch noch nicht erreicht worden. Diese Art der Samenkonservierung ist vorzüglich geeignet, das Sperma weite Transporte ungeschädigt überstehen zu lassen und wertvolles männliches Erbgut jahrelang zu erhalten.

Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, die Methodik der für Schweinesamen günstigsten Tiefgefrierung, die die Erprobung geeigneter Puffer, Frostschutzmittel, der Art der Einfrierung und des Auftauens voraussetzt, zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher auf Anregung von Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Baier mit den Möglichkeiten der Tiefkühlung von Ebersperma.

Literatur

Das Tiefgefrieren von für die künstliche Besamung bestimmtem Samen setzt eine Reihe von Kenntnissen voraus, die sich vor allem auf die Samengewinnung, die Physiologie des Spermas und daraus folgend auf die Verträglichkeit verschiedener Verdünner, der Mittel, die Tiefkühlung zu überstehen, sowie schließlich auf die Methodik selbst beziehen.

Die Samengewinnung

Während die künstliche Besamung bei anderen Haustieren schon seit längeren Jahren durchgeführt wird, wird von der Samengewinnung vom Eber erst im Jahre 1912 berichtet. Iwanow war der erste, der zu dieser Zeit Ebersperma zunächst von geschlachteten oder kastrierten Tieren gewann. McKenzie (20) versuchte dann 1931 mit einer Art Kondom abzusamen. Mit der Entwicklung der künstlichen Besamung anderer Tiere wurden die Methoden der Samengewinnung auch auf das Schwein übertragen. Nachdem sich bei Rind und Pferd die Rückgewinnung des Samens aus der Scheide nach dem Deckakt durch Schwämmchen,

Aufsaugkatheter und Samenlöffel nicht bewährt hatte, ging man dazu über, künstliche Scheiden zu entwickeln, mit deren Hilfe unveränderter Samen auch vom Schwein gewonnen werden konnte (G ö t z e 9). Die ersten Versuche wurden 1931 in Rußland an Schweinen durchgeführt, wobei R o d i n und L i p a t o v ein Phantom zur Samengewinnung benutzten (O l b r y c h t 24). Erfolgreiche Ergebnisse durch Elektroejakulation hatten D z i u k, G r a h a m, D o n k e r, M a r i o n und P e t e r s e n (6). Sie führten eine bipolare Elektrode in das Rektum des Ebers ein. Das Verfahren hat sich in der Praxis jedoch nicht durchgesetzt. Als die dem natürlichen Vorgang am besten entgegenkommende Methode hat sich die Samenentnahme mit Hilfe der künstlichen Scheide bewährt.

Die heute verwendeten künstlichen Scheiden für Eber sind sich alle in ihrer Konstruktion ähnlich. Sie setzen sich aus dem äußeren Mantelrohr, das in der Mitte mit einer Öffnung für den sogenannten Siroverschluß (Einfüllstutzen) versehen ist, dem Innenschlauch, den Schwammgummieinlagen, dem Samenauffangglas und dem Pulsator zusammen. Die Enden des elastischen Vagineninnenschlauches werden über die Enden des starren Mantelrohres gezogen. Der Hohlraum zwischen Mantelrohr und Innenschlauch wird mit den Schwammgummieinlagen ausgepolstert (G ö t z e 9).

Das Samenauffanggefäß, das aus Glas oder Kunststoff besteht, ist an der einen Öffnung des Innenschlauches zu befestigen (G ö t z e 9, B o n n a d o n n a 3, G l o v e r (8). Durch den Einfüllstutzen kann in den Hohlraum zwischen Innenschlauch und Mantelrohr warmes Wasser eingegossen werden. Dieser Stutzen dient außerdem als Ansatz für den Pulsator, der aus einem Gummiball, einem Gummischlauch und einem Ansatzkonus besteht (B o n n a d o n n a 3). P o l g e (31) benützt zwei Gummibälle, wobei einer zum Luftansaugen, der andere zur Kompression dient. Durch den Pulsator wird eine weitgehende Anpassung der künstlichen Scheide an den korkenzieherähnlichen, relativ dünnen Penis erzielt.

Zur Erreichung optimaler physiologischer Gegebenheiten wird die künstliche Vagina im allgemeinen vor und während des Gebrauches auf eine bestimmte Temperatur erwärmt. Die optimale Innentemperatur der Scheide, mit dem Thermometer im Lumen des Schlauches gemessen, beträgt nach G ö t z e (9) 38—41° C. Das in das Mantelrohr eingefüllte Wasser soll nach B o n n a d o n n a (3) eine Temperatur von 40° C, nach L a m b e r t und M c K e n z i e (16) von 54° C und nach G ö t z e (9) von 55—60° C haben. P o l g e (31) füllt die künstliche Vagina mit 40° C warmen Wasser, das vor der Inbetriebnahme wieder abgelassen wird. Daran anschließend wird mit dem Pulsator Luft eingepumpt. L a m b e r t und M c K e n z i e (16) halten eine Anwärmung der Scheide nur bei kalter Witterung für erforderlich. Auch B o n n a d o n n a (4), G l o v e r (8), M c K e n z i e, M i l l e r und B a u g u e s s (21) messen einer konstanten Innentemperatur der Scheide keine wichtige Bedeutung zu.

Für die Samengewinnungen läßt man nach Empfehlungen von Götze (9), Lambert und McKenzie (16) den Eber auf eine mittels Oberkieferschlinge oder Bauch-, Hals-, Rücken-, Schulter- oder Hinterschenkelgurt fixierte rauschige Sau springen. Dabei wird der Penis von dem Operateur in die künstliche Vagina gelenkt und der Pulsator nach der Immissio penis oder nach Beendigung der Friktionsbewegung in Tätigkeit gesetzt [Bonnadonna (3)]. Über die Verwendung eines Ständebers oder eines Phantoms wird nachher berichtet.

Zur Verarbeitung von Ebersperma empfiehlt es sich, das in 3 Phasen abgegebene graue, dicke Ejakulat fraktioniert zu gewinnen. Eine vollkommene Trennung des spermienreichen Anteils von den akzessorischen Sekreten durch fraktionierte Gewinnung ist sehr schwierig, da die erste Hauptphase bereits Auscheidungen der Nebendrüsen enthält [Götze (9)]. Lambert und McKenzie (16), Ito, Niwa, Kudo, Mizuho (14) und Perry (26) empfehlen aber trotzdem, mit getrennt gewonnenen Fraktionen zu arbeiten, die durch Auswechseln der Samenauffanggefäße gewonnen wird. Leichter ist es, die meist in Flockenform austretenden Bulbourethraldrüsensekrete mit einem Sieb oder steriler Gaze abzufiltrieren Polge (31), McKenzie, Miller, Bauguess (21).

Die Samengewinnung an Standtieren ist häufig erschwert, weshalb für Ab-samungen im Routinebetrieb besser ein Phantom verwendet wird. Das erste Schweinephantom wurde, wie schon erwähnt, in Rußland von Rodin und Lipatov entwickelt [Olbrycht (24)]. Götze (9) empfiehlt das Phantom der Gestalt einer Erstlingssau aus Holz oder Eisen nachzubilden und es mit Stoff oder Leder zu überziehen. Am caudalen Ende soll es eine Öffnung zur Anbringung der artifiziellen Vagina besitzen. Bonnadonna (4) verwendet ein gepolstertes Eisengestell, das mit Leinen überzogen ist. Baier und Grauvogl (2) benutzen ein überpolstertes bankförmiges Gerät nach Art eines niederen Tüncherbockes von der Höhe eines Mutterschweines. Zur Anpassung an die Größe des Ebers sind die vier Füße getrennt voneinander verstellbar.

Das Ejakulat des Ebers

Die Menge des Gesamtejakulates liegt bei Ebern der veredelten Landschweinrasse im Mittel bei 320 ccm [Götze (9)]. Sie ist abhängig von der individuellen Anlage, dem Alter, der Ernährung und Haltung sowie der Geschlechtsbeanspruchung der Tiere. McKenzie, Miller und Bauguess (21) geben eine Menge von 125—500 ccm an, Glover (8) beobachtete 500 ccm und mehr.

Die Dichte von Schweinesperma beträgt nach Polge (31) 10 000 bis 1 000 000 Spermien pro Kubikmillimeter. Mc Kenzie, Miller und Bauguess (21) sowie Perry (26) fanden 25 000 bis 1 000 000 Spermien pro Kubikmillimeter.

Liebenberg (17) wie Götze (9) 50 000 bis 1 000 000. Aus den unterschiedlichen Angaben geht hervor, daß die Dichte des Ejakulates von ein und demselben Eber sowie von verschiedenen Tieren starken Schwankungen unterworfen ist. Dies mag zur Ursache haben, daß der Sekretanteil der akzessorischen Geschlechtsdrüsen starken Schwankungen unterliegt [Götze (9)]. An Hand der Samendichte allein kann das Sperma jedoch nicht beurteilt werden. Stets sind Lebensdauer, Resistenz und Morphologie der Samenfäden mit zu berücksichtigen [Götze (9)].

Der pH-Wert des Gesamtejakulates liegt durchschnittlich bei 7,4 [Götze (9)], 7,2 — 7,8 [Liebenberg (17)], 7,3 — 7,9 [Mc Kenzie, Miller und Bauguess (21)].

Wie bereits angedeutet, gibt der Eber das Ejakulat in mehreren Phasen ab, und zwar unterscheidet man 1. die Vorphase, 2. die erste Hauptphase und 3. die zweite Hauptphase. Die Vorphase dauert etwa 1 — 5 Minuten. Während dieser Zeit werden lediglich 20 — 30 ccm des stark alkalischen (pH 8,0 — 9,0), wäßrig-serösen Urethraldrüsensekretes abgesondert. Die erste Hauptphase ist die sogenannte spermienreiche Fraktion, die mit dem Einsetzen der Ejakulation beginnt. Sie dauert ca. 2 — 5 Minuten. Das dabei abgesonderte, milchähnliche, fast neutrale Sekret besteht aus den Spermien des Nebenhodenschwanzes, Prostatasekret und geringen Beimengungen sagokleisterähnlicher Flacken aus den Bulbourethraldrüsen. Die Menge beträgt ca. 50 — 200 ccm. Die zweite Hauptphase, während der 80 — 250 ccm gelatinöses Material ausgeschieden wird, setzt sich vor allem aus Samenblasen- und Bulbourethraldrüsensekret zusammen [Götze (9)].

Zur Weiterverarbeitung des Samens wird lediglich das Sekret der ersten Hauptphase verwendet. Daher ist eine fraktionierte Gewinnung des Samens erforderlich. Dies entspricht der Auffassung von Folge (31), Rowson (33) und Götze (9).

Die Konservierung von Ebersperma

Will man die Zeit zwischen Samengewinnung und Samenübertragung möglichst lange ausdehnen, so ist eine Konservierung des Spermas nötig, da die natürliche Lebensdauer der Spermien begrenzt ist. Bekanntlich unterliegen die

im Nebenhodenschwanz gespeicherten Spermien besonders günstigen physiologischen Bedingungen. Diese sind gegeben durch das Vorhandensein ernährender Sekrete, der Resorptionsfähigkeit von Stoffwechselprodukten durch das Nebenhodenepithel und die Anwesenheit von Schutzkolloiden. Die Spermien werden so gegen äußere Einwirkung geschützt, wobei Bewegung und Stoffwechsel, also auch der Sauerstoffverbrauch herabgesetzt sind. In dem als Speicherorgan dienenden Nebenhodenschwanz herrscht außerdem ein niedriger pH-Wert (5,6 — 6,8) und ein elektrolytarmes Milieu. Auch die Temperatur im Hoden liegt durch die anatomische Lage der Testikel im Scrotalsack außerhalb der Körperhöhle um 3 — 4° C unter der Körpertemperatur.

Es ist also für die Lebenserhaltung ejakulierter Spermien *in vitro* ein Milieu zu schaffen, das den Verhältnissen im Nebenhoden möglichst ähnlich ist. So müssen Konservierungsmittel für Spermien eine ernährende, schutzkolloidale und puffernde Wirkung haben.

Als ernährende Zusätze werden für Rindersperma hauptsächlich gelöste Zucker verwendet. Die Spermien sind in der Lage, gelöste Monosaccharide zu spalten. Dabei entsteht durch Glykolyse Milchsäure, die den pH-Wert nach der sauren Seite verschiebt. Der günstigste pH-Bereich zur Spermaaufbewahrung liegt bei 6,0, bei dem die Beweglichkeit der einzelnen Spermien herabgesetzt und damit der Energieverbrauch gesenkt wird. Sinkt der pH-Wert unter 5,5 ab, sterben die Samenzellen jedoch rasch ab. Im natürlichen Medium werden die sauren Stoffwechselprodukte vom Nebenhodenepithel resorbiert. *In vitro* versucht man diesen Effekt nachzuahmen, indem man die entstehenden Säuren durch Citrat-, Phosphat- oder Carbonatverbindungen abpuffert. Dies ist aber nur so lange möglich, wie die Pufferungskapazität ausreicht.

Als Schutzkolloide eignen sich wiederum Traubenzuckerlösungen, ferner auch Eidotter oder inaktiviertes Serum, wobei immer auf die Wahrung der Isotonie zu achten ist.

Die Herabsetzung des Stoffwechsels, also der Bewegungsintensität wirkt sich, wenn die Bedingungen im Nebenhoden möglichst genau nachgeahmt werden, lebensverlängernd auf die Samenzellen aus. Der Stoffwechsel der Spermien wird durch die unerwünschte Milchsäurebildung gehemmt. Die Anwesenheit von Sauerstoff beschleunigt den Lipidstoffwechsel und oxydiert zu rasch die spermaeigene Substanz.

Ein hoher Elektrolytgehalt wirkt sich ungünstig auf das Ruhestadium der Spermien aus. Das Gesamtebjakulat ist infolge des großen Anteils von Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sehr elektrolytreich. Das gilt auch für die Ejakulate von Pferd und Hund. Hierdurch sind diese in ihrer elektrischen Ladung labiler als Bullenspermatozoen. Im Nebenhodenschwanz sind die Spermien negativ geladen [Salisbury und van Demark (37)].

Als Agglutinationsschutz ist im Schweinesperma ein unspezifisches Spermaagglutinin zu finden. Die aktive Form des Spermaagglutinins ist an die Oberfläche der Spermien gebunden, sie befindet sich im redoxierten Zustand. Bei der Oxydation geht die aktive Form in die inaktive über und daher die Schutzfähigkeit verloren. Im normalen Ebersamen wird die Oxydation durch das reichlich vorhandene Ergothionin und die Ascorbinsäure verzögert [Lindahl und Kihlström (18)].

Die Verdüner

Unter Berücksichtigung aller vorgenannten Voraussetzungen wurden entsprechende Verdüner für Schweinesperma zu entwickeln versucht. Milowanow (22) benutzte erstmals für die Verdünnung von Ebersperma folgende Substanzen:

Aqua dest.	100,0 ml
Glukose	4,6 g
Natriumsulfat	0,28 g
Pepton (nicht nötig)	0,35 g

Das Natriumsulfat kann durch 0,56 g Kaliumnatriumtartrat substituiert werden. Der Autor erprobte diesen Verdüner in einer Konzentration von 1 : 1 und 1 : 3. Die maximale Lebensdauer der Spermien bei Kühlschranktemperatur betrug bei Glukosesulfat 148 Stunden und bei Glukosetartrat 96 Stunden. Die Verdünnung war 1 : 1.

Für die Herstellung serumhaltiger Verdüner empfiehlt Milowanow folgende Zusammensetzung:

Aqua dest.	100,0 ml
Glukose	5,5 g
i. a. Pferdeserum	5,0 — 20,0 ml

Das Verdünnungsverhältnis betrug 1 : 1 und 1 : 3. Die maximale Lebensdauer von 150 Stunden wurde bei diesem Verdüner mit 5,0 ml Serumanteil in einer Verdünnung von 1 : 3 erreicht. Ito, Niwa, Kudo und Mizuhō (14) empfehlen einen Verdüner, der folgende Zusammensetzung besitzt:

Natriumchlorid	0,7%
Glukose	5 — 6 %
Saccharose	10 %

Götze (9) gibt an, daß sich reine Glukosesubstrate weniger günstig erweisen als Eidotter-Glukose-Medien. Er erprobte drei verschiedene Verdüner:

1. Glukose	4,5 oder 5,5 g
Aqua dest.	ad 100,0 g
2. Glukose	5,5 g
Eidotter	2,0 g
Aqua dest.	ad 100,0 g
3. Glukose	5,5 g
i. a. Pferdeserum	5,0 g
Aqua dest.	ad 100,0 g

Der Verdünnungsgrad betrug 1 : 1 und 1 : 3. Eine optimale Lebensdauer von 120 Stunden im Kühlschrank wurde bei 1. und 2. mit einer Verdünnungskonzentration von 1 : 3 erzielt. Die maximale Lebenszeit der Spermien im Eidotterverdünner 3. lag bei 108 Stunden. Es zeigte sich kein Unterschied bei den einzelnen Verdünnungskonzentrationen. Noll (23) beobachtete, daß der Zusatz von reinem Eigelb im Verhältnis 1 : 2 dem Sperma zugesetzt, die Lebenszeit auf 9 — 11 Tage (bei 5° C) verlängerte. Polge (27) empfiehlt folgende Verdünnner:

1. Glukose	2,0 g	2. Glycin	2,0 g
Eidotter	30,0 ml	Eidotter	30,0 ml
Aqua dest.	70,0 ml	Aqua dest.	70,0 ml

Verdünt wurde von 1 : 1 bis 1 : 19. Bei beiden Verdünnern wurde eine maximale Lebensdauer von 5 — 6 Tagen bei einer Aufbewahrungstemperatur von 5° C erreicht.

Die Verwendung eines Citratpuffers wird von Polge nicht befürwortet. Dagegen bewährte sich der Zusatz von je 500 IE. Penicillin-Streptomycin auf 1 ml Flüssigkeit gut. Die Erfolge wurden damit um 40% gesteigert. Auch Noll (23) machte ähnliche Beobachtungen bei der Zugabe von 300 mg Sulfonamid je 100 ml. Ebenso wie Polge hatte er schlechtere Ergebnisse mit citrathaltigen Verdünnern. Dieselbe Ausfassung teilt auch Roy (36), der außer einem 4,5%igen Glycin-Eidotter-Verdünnner eine 3,2%ige Natriumcitrat-Eidotter-Lösung verwendete, die zentrifugiertem Sperma zugesetzt wurde. Dabei blieben die Spermien bei einer Aufbewahrungstemperatur von 4° C nur 30 Stunden voll beweglich.

Kerruish (15) erläutert, daß die Anwendung homogenisierter Milch sich bei langer Aufbewahrungszeit ungünstig auf das Leben der Spermien auswirkt. Magermilch sei dagegen besser.

Die Tiefkühlung

Die Konservierung des Spermas mit einem Verdünner und einer Aufbewahrungstemperatur von + 5° C ist nur für einen relativ kurzen Zeitraum geeignet.

Die Tiefkühlung bietet dagegen die Möglichkeit, das Sperma jahrelang zu erhalten. Tiefgefrorenes Sperma befindet sich im Zustand der völligen Kältestarre. Diesem Stadium geht die Kälteträgheit voraus. Sie beginnt mit einer Temperatur von 5°C . Bei tiefgeköhltem Sperma findet keine Glykolyse statt. Es herrscht völlige Anabiose. Bei Erwärmung setzt die Beweglichkeit wieder ein. In schwach sauer reagierendem Milieu geht die Wiederbelebung langsamer vor sich als in schwach basischem.

Bei der Tiefgefrierung der Spermien kann es zu einer Reihe von schädlichen Einflüssen kommen. Wichtig ist zunächst die Art des Abköhlens. Durch zu raschen Temperaturabfall kommt es zu einem Kälteschock des Spermas, der sich ungünstig auf Motilität und Befruchtungsfähigkeit auswirkt. Er wird bei geeigneten Köhlgeschwindigkeiten vermieden. Eine weitere Gefahr ist die Entstehung von Zellschädigungen im Sperma durch Eiskristalle und die Änderung der Konzentrationsverhältnisse während des Gefrierprozesses. Das Sperma enthält wie jede Zelle einen hohen Prozentsatz an Wasser. Beim Gefriervorgang kommt es zur Bildung von Eiskristallen im Protoplasma, wodurch die Zellstruktur auf mechanischem Wege zerstört wird.

Je geringer der Wassergehalt einer Zelle ist, desto gefahrloser wird sie die Tiefkühlung überstehen. Darum setzt man dem tiefzufrierenden Medium eine hygroskopische Substanz zu. Vor allem Glycerin beeinflusst die Bildung von Kristallen, welche bei der Tiefkühlung auftreten, dahingehend, daß mehrere und kleinere gebildet werden. Sie zerstören die Zellstruktur weniger, als die großen, welche beim Tiefköhlprozeß ohne Glycerin entstehen. Wie *P o l g e* und *P a r k e s* (27) berichten, ist man auf der Suche nach neuen Polyalkoholen, um das Glycerin zu ersetzen, welches heute immer noch das Mittel der Wahl ist.

Die Glycerinverträglichkeit des Eberspermas

Es waren vor allem *P o l g e* und *R o w s o n* (26), die die Tiefkühlung von Bullensperma entwickelten. Die Technik der Tiefgefrierung erfuhr mit der Zeit Perfektionen. Die grundlegende Methode blieb jedoch im allgemeinen dieselbe.

Hinsichtlich der Glycerinverträglichkeit des Schweinespermas sind *P o l g e* (31) und *R o w s o n* (34) der Auffassung, daß sich der Glycerinzusatz schädigend auf die Spermatozoenbeweglichkeit auswirkt. *R o y* (36) stellte dagegen fest, daß die Bewegungsintensität bei glycerinhaltigen Verdünnern nicht vermindert ist. Die Frage, ob der Glycerinzusatz auf einmal oder fraktioniert zuzufügen sei, beantwortet derselbe Autor dahingehend, daß das Frostschutzmittel in 4 Portionen mit einem zeitlichen Abstand von je 15 Minuten zuzusetzen ist.

P o l g e (31) erprobte eine Methode, bei der er einen Vorverdünner ohne Glycerin und einen Nachverdünner mit Glycerin benutzte. Dies entspricht der für Bullensperma gebräuchlichen Arbeitsweise von E i b l, U r b a s c h e k und Z o d e r (7).

P o l g e (31) stellte fest, daß Eberspermien die Tiefkühlung in einem Glycin-Dottermedium im Verdünnungsverhältnis 1 : 1 schlecht überstehen. Ähnliche Ergebnisse hatte G l o v e r (4). R o y (36) benutzte zentrifugierten Samen in einer Eidotter-Glycinlösung, die 20% Glycerin enthielt und erzielte bessere Ergebnisse. Die Equilibrationsdauer betrug 26 Stunden. P o l g e (31) dagegen gibt 3 Stunden an. Bei der Tiefgefrierung von Rindersperma wird von den meisten Autoren eine Equilibrationsdauer befürwortet. S h e r m a n (38) behauptet, daß es bei Sperma des Menschen unwesentlich sei, ob eine Equilibrationsdauer eingehalten, oder das Sperma sofort nach dem Glycerinzusatz eingefroren wird. B a h l a u (1) gibt an, daß sich bei Hundesperma eine Adaptionszeit ungünstig auf das Leben der wiederaufgetauten Spermien auswirkte.

Eigene Untersuchungen

Die Versuche an Schweinesperma wurden in der Zeit zwischen April 1958 und Januar 1959 durchgeführt. Untersucht wurden insgesamt 246 Ejakulate von sechs Ebern. Davon wurde an 107 Ejakulaten die Verträglichkeit verschiedener Verdünner erprobt und 412 Proben wurden eingefroren. Zum Abschluß der Versuche wurden 11 Sauen mit tiefgefrorenem Sperma besamt.

Die Versuchstiere gehörten sämtlich der Rasse des deutschen veredelten Landschweines an. Sie wurden alle unter gleichen Stallverhältnissen und Fütterungsbedingungen gehalten und waren in gutem Gesundheitszustand.

Die Samengewinnung

Die Eber wurden mit der künstlichen Scheide abgesamt. Hierzu fand eine modifizierte Rinderscheide Anwendung, in deren Hohlraum zwischen Vaginen-innenschlauch und Mantelrohr sich zwei Schaumgummistreifen zur Angleichung des Lumens an den dünnen Schweinepenis befanden. Vor dem Absamen wurde die Scheide jeweils mit 80° C warmem Wasser gefüllt, das erst kurz vor dem Einführen des Penis abgelassen wurde, so daß die Temperatur, mit dem Thermometer im Lumen der künstlichen Vagina gemessen 38 — 40° C betrug. Nach dem

Ablassen des Wassers wurde der Pulsator an den Einfüllstutzen angeschlossen. Der Pulsator besteht aus einem Gummiball als Gebläse und einem Gummischlauch mit passendem Konus für den Einfüllstutzen. Als Samenauffangglas fand ein weithalsiges Kotglas Verwendung. Bei der fraktionierten Samengewinnung wurde dieses durch einen Scheidetrichter von 500 ml Inhalt ersetzt. Der Hals des Trichters wurde mit einem Mulltuch bedeckt, damit eine sofortige Abfiltrierung des Bulbourethraldrüsensekretes erfolgen kann. An dem Trichterende sitzt auf einem durchbohrten Gummistopfen ein Glaskolben von 50 ml Fassungsvermögen zum Auffangen des Vorphasensekretes (Urethraldrüsensekret). Sobald der Eber mit den Friktionsbewegungen aufhört und sich entspannt, wird der Hahn des Scheidetrichters geschlossen. Auf diese Weise erhält man reines Sekret der 1. und 2. Hauptphase mit Ausnahme des Anteils der Bulbourethraldrüsen. Das Urethraldrüsensekret befindet sich in dem kleinen Glaskolben, das Bulbourethraldrüsensekret in der Gaze auf dem Scheidetrichter.

Die Eber wurden zum Teil auf Standebnern, die mit einem Rüsselstrick fixiert waren, im allgemeinen jedoch auf einem Phantom (nach Baier und Grauvogel (2) abgesamt. Dieses besteht aus einem lederüberzogenen Bock, der auf 4 verstellbaren Eisenfüßen steht. Die Eber nehmen das Phantom meist willig an. Bei vorübergehender Libidoschwäche empfiehlt sich das Bestreichen des caudalen Bockendes mit Ebersperma, Brunstsekret oder besonderen Duftstoffen. Auch durch behutsames Auflegen des Kopfes auf das caudale Phantomende kann der Eber mitunter zum Aufspringen veranlaßt werden.

Sobald der Eber das Phantom besprungen hat, begibt sich der Operateur auf die linke Seite des Tieres. Nach dem Austritt des Penis wird mit der rechten Hand das Präputium leicht zurückgeschoben. Mit der künstlichen Vagina, die die linke Hand hält, unterstützt man die Suchbewegung des Penis und leitet ihn das Lumen ein. Vorher ist das Wasser aus der Scheide abzulassen und der Innenraum durch den Pulsator mit Luft zu füllen. Nach der Immissio wird der Pulsator rhythmisch etwa 80mal in der Minute in Tätigkeit gesetzt; so lange, bis der Eber durch das sogenannte „Schlußpatschen“, eine Art Schmatzen, die Beendigung des Deckaktes angibt.

Bei der fraktionierten Samengewinnung bleibt der Hahn des Scheidetrichters so lange offen, bis der ganz seröse, wäßrige Anteil des Urethraldrüsensekretes in das untere Auffangglas gelaufen ist. Sobald das dicke, milchige Sekret der spermienreichen Hauptphase in das Zylinderinnere einfließt, wird der Hahn geschlossen. Dadurch ist das Sekret der Vorphase von dem der Hauptphase getrennt.

Sämtliche Eber nahmen die künstliche Scheide an, auch wenn die Innentemperatur etwa 10° C über oder unter 39° C lag. Ebenso wurde mit Ausnahme libidoschwacher Tiere eine Ejakulation erzielt, wenn ohne Schwammgummi-

polster im Scheideninnern abgesamt wurde. Ohne Pulsator konnte kein Eber zur vollständigen Ejakulation gebracht werden. Während des Absamens muß das Phantom von einer Hilfsperson festgehalten werden, weil es die Eber während des Liebesspiels gern umwerfen. Außerdem ist auf dem Boden eine nicht verschiebbare Sprungmatratze auszubreiten, um ein Ausgleiten des Ebers zu verhindern. Stallfremde Personen sollen möglichst ferngehalten werden, geräuschloses Arbeiten während der Entsamung ist erforderlich, um die Tiere nicht abzulenken. Aus demselben Grunde sollte auch die Absamung stets in der gewohnten Umgebung des Tieres erfolgen.

Vor der Samenentnahme ist das Präputium des Ebers tunlichst mit physiologischer Kochsalzlösung zu reinigen.

In vereinzelt Fällen urinierten die Tiere während der Friktionsbewegungen in die künstliche Scheide. Dieser verunreinigt gewonnene Samen wurde von jedem Versuch ausgeschlossen.

Die Untersuchung des Ejakulates

Es wurden sowohl Gesamtejakulate, als auch die zweite Phase der Ejakulate allein untersucht.

Die Menge des Gesamtejakulates ohne Filtrat belief sich auf ein Volumen von 80 — 250 ml. Die Gelenksubstanz (2. Hauptphase) variierte von 74 — 25 g. Der pH-Wert des Gesamtejakulates lag im Bereich von 7,2 — 7,8.

Das Gesamtejakulat war gewöhnlich weiß-grau-gelb gefärbt und sah milch-ähnlich aus. Bei längeren Absampausen von etwa 8 — 10 Tagen trat des öfteren ein Gelbstich des Samens auf. Nach 2 bzw. 3maliger Samenentnahme während eines Tages, in Abständen von 3 Stunden, hatte das Ejakulat eine dünnflüssige, durchsichtige Beschaffenheit. Das Sekret der Hauptphasen war undurchsichtig und visköser als das Gesamtejakulat.

Die Dichte variierte bei Gesamtejakulaten von 103 000 bis 940 000, die der Hauptphasen von 230 000 bis 630 000 Spermien pro Kubikmillimeter.

Zwischen der Dichte im Gesamtejakulat und im fraktioniertgewonnenen Samen besteht nur ein geringer Unterschied, da die spermienfreie Vorphase mengenmäßig keinen allzu großen Anteil am Ejakulat besitzt. Die spermareiche

Fraktion ist die 1. Hauptphase. Die 2. Hauptphase enthält dagegen weniger Samenfäden.

Bei der Beurteilung der Massenbewegung des Gesamtejakulates wurden folgende Schema angewandt:

M —	keine Massenbewegung
M +	schwache Massenbewegung
M + +	gute Massenbewegung
M + + +	sehr gute Massenbewegung
M + + + +	außerordentlich gute Massenbewegung

Bei 82 Absamungen wurde

13mal	M —
21mal	M +
22mal	M + +
26mal	M + + + festgestellt.

Außerordentlich gute Massenbewegung wurde nur bei fraktioniert gewonnenem Samen in den Hauptphasen, in 19 Fällen, beobachtet. Dies dürfte auf die stärkere Konzentration des Spermas zurückzuführen sein.

Als weiteren Bewertungsmaßstab der Lebenstüchtigkeit der Spermatozoen wurde das Ejakulat nach der Individualbewegung der einzelnen Spermien begutachtet. Als Individualbewegung wird die Geschwindigkeit und Kraft der Vorwärtsbewegung der einzelnen Spermien bestimmt. Es wurde nach dem gleichen Schema wie für die Massenbewegung verfahren: I —, I +, I + +, I + + +, I + + + +.

Die Untersuchung von 82 Gesamtejakulaten ergab:

1mal	I —
20mal	I +
33mal	I + +
28mal	I + + +

Eine Individualbewegung von I + + + + ist desgleichen nur bei fraktioniertgewonnenem Samen in allen Hauptphasen gesehen worden.

Die Vorwärtsbewegung der Spermien betrug bei keinem Ejakulat 100%. Das Maximum, welches erreicht wurde, lag bei 90% im Gesamtejakulat und bei 95% im fraktioniert gewonnenen Samen (Hauptphase). Das Minimum lag bei 10%. Libidoschwache sowie geschlechtlich überbeanspruchte Tiere zeigten ein schlechteres Samenbild als Eber mit starker Geschlechtslust, und solche, die wöchentlich nur zweimal abgesamt wurden. Nach längeren Absampausen (bis

zu 15 Tagen) war eine wesentliche Veränderung des mikroskopischen Bildes der Spermien nicht regelmäßig zu beobachten. Vereinzelt war jedoch der Prozentsatz der Vorwärtsbewegung herabgesetzt.

Die Lebensdauer von unverdünntem Ebersperma der Hauptphasen betrug bei Beachtung aller steriler Kautelen bei Zimmertemperatur etwa 9 Stunden, danach war ein plötzlicher Abfall der Motilität zu bemerken. Nach 24 Stunden waren die Spermien ausnahmslos abgestorben. Die maximale Lebensdauer im Kühlschrank bei 5° C betrug 25 Stunden. Im Brutschrank mit einer Temperatur von 38° C war nur in vereinzelt Fällen nach 8 Stunden noch eine Vorwärtsbewegung zu erkennen.

Die Verdünner

Insgesamt wurden 107 Ejakulate zu 216 Verdünnungen verarbeitet. Der Verdünnungsgrad war 1 : 3. Die Aufbewahrungstemperatur betrug + 5° C. Der Temperaturangleich zwischen Sperma und Konservierungsmittel erfolgte bei 25° C im Wasserbad. Das Ejakulat wurde sofort nach der Gewinnung verdünnt, unter der Voraussetzung, daß es sich bei der mikroskopischen Lebenduntersuchung als brauchbar erwies. Ejakulate, die einen geringeren Prozentsatz als 50 an vorwärtsbewegenden Spermien aufwiesen, wurden nicht verarbeitet. Bei den jeweiligen Untersuchungen der Spermaproben wurde jeder Temperaturwechsel vermieden. Den Aufbewahrungsgefäßen wurde daher im Kühlschrank ein Tropfen Samen mit einem Kapillarröhrchen entnommen, so daß die Temperatur im Medium stets annähernd konstant blieb.

Das Sperma wurde auf dem Heiztisch bei 38° C unter dem Mikroskop beobachtet. Insgesamt wurden 26 Ejakulate mit Glukose-, 22 mit Glycin-, 44 mit Eidotter- und 23 mit Milchezusätzen in verschiedenen Konzentrationen verdünnt. Bei Eidotterverdünner gelangten höchstens zwei bis drei Tage alte Eier zur Verwendung.

Zunächst wurden reine Glukose-Verdünner untersucht. Hierbei sollten die dem Sperma günstigsten Konzentrationen ermittelt werden. Nur die Hauptphasen der Ejakulate kamen dabei zur Verwendung. Das Sperma jeweils eines Ejakulates wurde mit den verschiedenen Konzentrationen des Konservierungsmittels verdünnt. Hiervon wurden 26 Ejakulate untersucht. Die Lösungen wurden ausnahmslos in Aqua bidest hergestellt.

Tabelle 1**Lebensdauer der Spermien in verschiedenprozentigem Glukose-Verdünner**

	Glukose - Konzentration					Glukose
	6 ⁰ / ₁₀	5 ⁰ / ₁₀	4 ⁰ / ₁₀	3 ⁰ / ₁₀	2 ⁰ / ₁₀	
Maximale Lebensdauer in Stunden	60	96	96	120	72	
Minimale Lebensdauer in Stunden	48	48	72	72	48	
Durchschnittl. Lebensdauer in Stunden	58	73	84	96	64	

Die optimale Konzentration schien danach zwischen 4% und 3% zu liegen. Aus diesem Grunde wurde in Zukunft mit einer 3,5%igen Lösung gearbeitet.

Die Resultate der Vorwärts- und Ortsbewegung innerhalb der einzelnen Konzentrationen nach 2 bzw. 3 Tagen gibt folgende Übersicht (Tab. 2).

Tabelle 2

		Glukose - Konzentrationen				
		6 ⁰ / ₁₀	5 ⁰ / ₁₀	4 ⁰ / ₁₀	3 ⁰ / ₁₀	2 ⁰ / ₁₀
Maximale Vorwärtsbewegung	in %	40	60	70	70	50
Minimale Vorwärtsbewegung	in %	30	40	50	50	30
Durchschnittl. Vorwärtsbewegung	in %	34	49	65	66	39
Durchschnittl. Ortsbewegung	in %	12	15	15	18	15

Auch hier liegt das Optimum zwischen einer 3% und 4%igen Glukoselösung.

22 weitere Ejakulate wurden mit G l y c i n in verschiedenen Konzentrationen verdünnt. Wie die folgende Tabelle zeigt, liegt auch hier das Optimum bei einer Konzentration von 3%.

Tabelle 3**Lebensdauer der Spermien in verschiedenprozentigen Glycin-Verdünnern**

	6‰	5‰	4‰	3‰	2‰	Glycin
Maximale Lebensdauer in Stunden	60	72	72	96	72	
Minimale Lebensdauer in Stunden	36	48	48	60	36	
Durchschnittl. Lebensdauer in Stunden	50	60	63	77	52	

Auch die Vorwärts- und Ortsbewegung der Spermien nach 2 bzw. 3 Tagen war in einem Verdünner, der 3‰ Glycin enthielt, am besten

Tabelle 4
Glycin-Konzentrationen

		6‰	5‰	4‰	3‰	2‰
Maximale Vorwärtsbewegung	in %	40	50	60	60	45
Minimale Vorwärtsbewegung	in %	30	30	35	35	30
Durchschnittl. Vorwärtsbewegung	in %	32	45	50	52	38
Durchschnittl. Ortsbewegung	in %	13,3	15	15	20	16

Im Vergleich der für die Lebensdauer der Spermien günstigsten Konzentrationen, die sowohl bei der Glukose als auch bei Glycin 3,5‰ betragen, zeigt sich eine Überlegenheit des Glukose-Verdünners. Die Leistung der reinen Glukose- und Glycin-Verdünnern ist jedoch, wie aus den Tabellen hervorgeht, gering. Das erklärt sich aus der Zuführung von das Sperma ernährenden Stoffen, die die Glykolyse und damit die Milchsäurebildung fördern.

Im folgenden wurden den Glukose- und Glycin-Verdünnern Eidotter zugesetzt, wobei der Dotteranteil von 15 bis 30‰ variiert wurde. Die verwendeten Glukose- und Glycinlösungen waren 3,5‰ig.

Um einen entsprechenden Vergleich zu haben, wurde ein und dasselbe Ejakulat zu einer Versuchsreihe zusammengefaßt. Das heißt, der gleiche Samen wurde mit den verschiedenprozentigen Dotter-Verdünnern behandelt. Angesetzt wurden 44 Versuchsreihen.

Tabelle 5

Lebensdauer der Spermien in 3,5% Glukose- und 3,5% Glycin-Verdünnern bei verschiedenen hohen Dotterzusätzen, sowie durchschnittliche Vorwärts- und Ortsbewegung der Spermien nach 3 bis 4 Tagen.

	Glukose Dotteranteil				Dotteranteil Glycin			
	15°/o	20°/o	25°/o	30°/o	15°/o	20°/o	25°/o	30°/o
Maximale Lebensdauer in Stunden	144	168	240	168	96	144	168	120
Minimale Lebensdauer in Stunden	96	120	144	144	48	96	120	72
Durchschnittl. Lebensdauer in Stunden	122	144	190	110	72	122	144	96
Durchschnittliche Vorwärtsbewegung nach 3 — 4 Tagen in %	30	40	55,8	44	30	33	40	35
Durchschnittliche Ortsbewegung nach 3 — 4 Tagen in %	19,6	19,4	17,4	18,7	19,8	19,5	18,2	18,4

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß der für das Sperma verträglichste Dotteranteil bei 25% liegt. Desgleichen wurde die günstigere Wirkung der Glukose bestätigt. Aus diesem Grunde schied der Glycin-Verdünnern für die später folgenden Tiefkühlversuche aus.

Des weiteren wurden verschiedene Milchverdünner auf ihre Verträglichkeit dem Sperma gegenüber untersucht, und zwar:

1. Gewöhnliche, pasteurisierte Milch, zubereitet nach der Beschreibung von Harrop (11). (Kurze Erhitzung auf 92° C.)
2. Magermilch aus Milchpulver (sog. Diätmilchpulver) bereitet, und zwar 10 g Milchpulver ad. 100,0 aqua bidest. Die Verwendung von Magermilch für Ebersperma wird ohne genaue Angabe auch von Rowson (33) und Polge (31) beschrieben.
3. Verwendung von Sauenmilch.

Alle drei Milchverdünner wurden mit einem Dotteranteil von 25% und ohne einen solchen an ein und demselben Ejakulat geprüft. Im ganzen kamen 32 Ejakulate zur Untersuchung.

Lebensdauer der Spermien in den verschiedenen Milchverdünnern mit und ohne Dotteranteil:

Tabelle 6
Lebensdauer der Spermien in Stunden

Verdünner	Maximal	Minimal	Durchschnittl.
Pasteurisierte Milch	84	60	76
Pasteurisierter Milch-Dotter	96	72	88
Magermilch	168	120	146
Magermilch-Dotter	216	144	182
Sauemilch	60	48	55
Sauemilch-Dotter	60	48	55

Tabelle 7
Vorwärtsbewegung der Spermien nach 6 Tagen in den Milchverdünnern (in %)

Verdünner	Maximal	Minimal	Durchschnittl.
Pasteurisierte Milch	0	0	0
Pasteurisierter Milch-Dotter	0	0	0
Magermilch	50	30	34,5
Magermilch-Dotter	60	40	40,7
Sauemilch	0	0	0
Sauemilch-Dotter	0	0	0

Aus der Aufstellung geht hervor, daß sich der Magermilchverdünner mit Dotterzusatz vor den Milchverdünnern als weitaus am günstigsten für die Lebensdauer der Spermien erwies. Dies zeigt sich auch bei der Prüfung der vorwärtsbewegenden Spermien nach 6 Tagen. Bei dem Vergleich aller erprobten Verdünner ergab sich folgende Aufstellung:

Tabelle 8**Lebensdauer in Stunden der Spermien in den untersuchten Verdünnern**

Verdünner	Maximal	Minimal	Durchschnittl.
Glukose 3,5%	120	72	96
Glycin 3,5%	96	60	77
Glukose-Dotter	240	144	190
Glycin-Dotter	168	120	144
Pasteurisierte Milch	84	60	76
Pasteurisierter Milch-Dotter	96	72	88
Magermilch	168	120	146
Magermilch-Dotter	216	144	182
Sauenmilch	60	48	55
Sauenmilch-Dotter	60	48	55

Tabelle 9**Vorwärtsbewegung der Spermien nach 6 Tagen in den untersuchten Verdünnern
(in %)**

Verdünner	Maximal	Minimal	Durchschnittl.
Glukose 3%	0	0	0
Glycin 3%	0	0	0
Glukose-Dotter	60	35	44
Glycin-Dotter	40	20	35
Pasteurisierte Milch	0	0	0
Pasteurisierter Milch-Dotter	0	0	0
Magermilch	50	35	40,1
Magermilch-Dotter	50	30	42,4
Sauenmilch	0	0	0
Sauenmilch-Dotter	0	0	0

Aus dieser Zusammenstellung geht die optimale Verträglichkeit des Glukose-Eidotter-Verdünners für das Sperma hervor. Er setzt sich, für die folgenden Versuche nochmals erwähnt, zusammen aus:

3,5 g Glukose
25,0 ml Eidotter
ad 100,0 ml Aqua bidest.

Mit diesem Verdünner wurde eine durchschnittliche Lebensdauer von 190 Stunden erreicht. Die maximalen Werte lagen bei 240 und die minimalen bei 144 Stunden. Die maximale Leistung, bezogen auf die Vorwärtsbewegung, lag am 6. Tag bei 60%, die minimale bei 35%, die durchschnittliche bei 47%.

Danach folgt mit kurzem Abstand der Magermilch-Verdünner mit Dotterzusatz und danach der reine Magermilchverdünner. Die weitere Rangordnung in Hinsicht auf die Verträglichkeit lautet: Glycin-Dotter, Glukose, Glycin, pasteurisierte Milch-Dotter, pasteurisierte Milch, Savenmilch und Savenmilch-Dotter.

Es wurden Versuche durchgeführt, bei denen sämtliche ausgetesteten Verdünner, mit Ausnahme der Savenmilch, variierende Konzentrationen von Natrium-Citrat erhielten. Dieser Zusatz erwies sich jedoch bei einer Aufbewahrungstemperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ als nicht spermafrendlich. Spätestens innerhalb 48 Stunden zeigten die Spermien bei starker Agglutination keine maßgeblichen Lebensäußerungen mehr. Ähnliche Beobachtungen machten auch Du Mesnil, du Buisson (5) und Roy (36).

Sperma mit sehr guter Massenbewegung ($M+++$) hatte eine bessere Lebensfähigkeit in den einzelnen Verdünnern, als solches mit ausreichender ($M+$).

Die Kraft der Einzelbewegungen ist nur ein relativer Maßstab für die Spermaurteilung, da abnorme Spermien sowie Kreisbewegung für eine Schädigung der Spermatozoen sprechen. Die Angaben über die Lebenszeiten beziehen sich daher auf Zeiträume, in welchen noch eine einwandfreie Vorwärtsbewegung oder Ortsbewegung ungeschädigter Spermien zu beobachten war.

Agglutination wurde ab und zu in allen Verdünnern beobachtet. Diese Erscheinung wird auf Bakterienbesiedlung, Schädigung der Spermien bei der Samenentnahme und bei der Verdünnung zurückzuführen sein. Sperma einzelner Eber zeigten eine besondere Bereitschaft zur Agglutination bei längerer Aufbewahrung. Hinzugefügt werden muß, daß alle Versuche unter Beachtung steriler Kautelen durchgeführt wurden.

Weiterhin scheint erwähnenswert, daß es Eber gibt, die besonders lebensfähiges Sperma besitzen. Dies kommt vor allen Dingen in den Spitzen der maximalen Lebensdauer bei den verschiedenen Verdünnern zum Ausdruck. Außerdem unterliegt die Qualität und die Vitalität des Ejakulates klimatischen und jahreszeitlichen Einflüssen.

Die Tiefkühlung des Eberspermas

Die Glycerinverträglichkeit des Eberspermas

Zur Durchführung einer erfolgreichen Besamung mit Tiefkühlsamen ist es erforderlich, bei dem Gefriervorgang durch Kristallbildung hervorgerufene Zellschädigungen zu vermeiden. Bei der Tiefkühlung von Rindersperma erwies sich das Glycerin als geeignetes Frostschutzmittel, bei dessen Zusatz die Spermien nach dem Auftauen befruchtungsfähig bleiben.

Da über diese Wirkung und vor allem über den Prozentsatz des Glycerinzusatzes für Schweinesperma in der Literatur noch Unklarheit herrscht, wurde zunächst die Frage der Glycerinverträglichkeit für Schweinesperma überhaupt sowie die optimale Konzentration zu klären versucht.

Die optimale Glycerinkonzentration

Zu diesem Zweck wurden 32 Ejakulate zu je 3 x 6 Versuchsreihen zusammengefaßt. Jedem Ejakulat wurden in dem entsprechenden Verdünner die verschiedenen Glycerinkonzentrationen zugesetzt.

Als Verdünner dienten:

1. Die 3,5%ige Glukoselösung mit 25% Dotteranteil
2. Magermilch mit 25% Dotteranteil
3. Reine Magermilch.

Die Magermilch wurde aus Pulver, wie vorher angegeben, bereitet. Diesen Verdünnern wurde Glycerin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Der Zusatz der glycerinhaltigen Verdünner zu dem Sperma erfolgte sofort nach der Samengewinnung, jedoch wurde vorher die Temperatur der zu vereinigenden Medien im Wasserbad bei 25° C angeglichen. Die Konzentration des Glycerins wurde von 4% bis 14% variiert.

Tabelle 10

**Durchschnittliche Lebensdauer der Spermien
in Stunden bei verschiedenen Glycerinkonzentrationen**

Verdünner	G l y c e r i n k o n z e n t r a t i o n					
	4%	6%	8%	10%	12%	14%
Glukose-Dotter.	168	168	185	180	96	55
Magermilch-Dotter	144	154	181	168	84	48
Magermilch	108	122	140	140	72	48

Auch bei Zusatz von Glycerin erwies sich der Glukose-Dotterverdünner den anderen beiden Lösungen in allen Versuchsreihen überlegen. Die günstigste Glycerinkonzentration, gemessen an der Lebensdauer der Spermien, liegt nach obiger Aufstellung zwischen 8 und 10%.

In diesem Bereich zeigte sich keine nachteilige Beeinflussung der Lebensdauer und der Beweglichkeit der Spermien im Vergleich zu den Verdünnern ohne Glycerin.

Konzentrationen des Glycerins über 10% schädigten dagegen den Samen. Konzentrationen unter 8% Glycerin können nicht unbedingt als schädlich für die Spermatozoen angesehen werden. Zu beachten ist dabei jedoch, daß die durchschnittliche Lebensdauer der Spermien etwas abnimmt.

In der Folge wurde daher mit einem Anteil von 9% Glycerin gearbeitet.

Methodik des Glycerin-Zusatzes

Als folgender Punkt sollte untersucht werden, ob der Zusatz des Glycerinverdünners sofort nach der Samengewinnung stattfinden muß, oder ob es vorteilhafter ist, das Sperma zunächst mit einem Vorverdünner zu behandeln und dann erst den glycerinhaltigen Nachverdünner zuzusetzen. Dabei erfolgt eine vorläufige Konservierung des Spermas mit einem Verdünner ohne Glycerin, der nach Ablauf einer bestimmten Zeit durch dasselbe, aber nun glycerinhaltige, Medium ergänzt wird.

Die Versuche wurden mit den gleichen Verdünnern wie vordem durchgeführt: Glukose-Dotter, Magermilch-Dotter und Magermilch. Es wurden 3 Versuchsgruppen eingeteilt:

1. In der ersten Gruppe wurde dem Samen sofort nach Gewinnung im Verhältnis 1 : 3 glycerinhaltiger Verdünner zugesetzt. Die Glycerinkonzentration betrug 9%.
2. In der zweiten Gruppe wurde das Sperma zunächst mit einem glycerinlosen sogenannten Vorverdünner im Verhältnis 1 : 1,5 verdünnt, nach 3, 6, 9 oder 12 Stunden wurden den Proben glycerinhaltiger Verdünner, sogenannter Nachverdünner, zugesetzt, und zwar derart, daß das endgültige Verdünnungsverhältnis wieder 1 : 3 betrug und eine Glycerinkonzentration von 9% erreicht wurde.
3. Die dritte Gruppe diente als Kontrolle. Dem Sperma wurden die entsprechenden Verdünner ohne Glycerin zugesetzt.

Der Zusatz des Nachverdünners erfolgte im Kühlschrank bei einer Temperatur von + 5° C. Jede Versuchsgruppe bestand aus drei Versuchsreihen für je eine der obengenannten Verdünner. Untersucht wurden 22 Ejakulate, wobei nach Möglichkeit jedes Ejakulat in allen drei Versuchsgruppen ausgetestet wurde.

Tabelle 11

**Durchschnittliche Lebensdauer der Spermien
in Stunden nach sofortigem oder späterem Zusatz von
9% Glycerin enthaltendem Verdünner**

Verdünner	ohne Glycerinzusatz (Gruppe 3)	mit Glycerinzusatz	
		(Gruppe 1) sofort	(Gruppe 2) nach 3, 6 9 oder 12 Stunden
Glukose-Dotter	187,3	185,6	96,8
Magermilch-Dotter	182,9	180,0	96,2
Magermilch	143,1	140,2	72,4

Zwischen den Kontrollgruppen und den Proben mit sofortigem Glycerinzusatz traten kaum Unterschiede in der Lebensdauer auf. Auch die Motilität der Spermien war in beiden Gruppen annähernd gleich. Eine deutlich negative Differenz tritt jedoch bei dem Glycerinzusatz nach 3, 6, 9 oder 12 Stunden ein. Aus diesem Grunde wurde der sofortige Zusatz von glycerinhaltigem Verdünner nach der Samengewinnung als günstig erachtet.

Fraktioniertes Zusetzen

Weiterhin wurde der Feststellung Beachtung geschenkt, ob es vorteilhafter sei, den Glycerinverdünner auf einmal oder in Fraktionen zuzusetzen. Unter fraktioniertem Zusatz wird das tropfenweise Zufügen von glycerinhaltigem Verdünner in einer bestimmten Zeiteinheit verstanden. Bei den folgenden Versuchen wurde pro Sekunde 0,1 ml mit einer graduerten Pipette zugesetzt. Untersucht wurden 20 Ejakulate.

Die Methode war folgende: der 9% Glycerin enthaltende Glukose-Dotterverdünner wurde dem Sperma sofort nach der Gewinnung oder 3 Stunden später in Fraktionen zugesetzt. Das Verdünnungsverhältnis betrug 1 : 3. Bei den Proben, denen das Glycerin nach 3 Stunden zugesetzt wurde, wurde das Ejakulat zunächst im Verhältnis 1 : 1,5 mit einem Vorverdünner und nach Ablauf der benannten Zeitspanne mit 1,5 Teilen des glycerinhaltigen Nachverdünners behandelt. Bei den Kontrollen wurde der Verdünner dem Sperma auf einmal sofort bzw. nach 3 Stunden zugesetzt. Die Temperatur betrug während der Behandlung und Aufbewahrung $+5^{\circ}\text{C}$.

Tabelle 12

**Einfluß des fraktionierten Zusetzens
des Verdünners auf die Lebensdauer der Spermien**

Glycerinzusatz	fraktioniert	auf einmal
sofort	86	185,6
nach 3 Stunden	72,9	96,8

Aus der Aufstellung geht hervor, daß sich das fraktionierte Zusetzen von Glycerin ungünstig auf die Lebensdauer der Spermien auswirkt. Dies mag in der zeitweise sehr unterschiedlichen Glycerinkonzentration in der Spermaverdünnung liegen, bei der Schwankungen des osmotischen Druckes auftreten, die die Spermatozoen schädigen. Auch wird die bei $+5^{\circ}\text{C}$ vorhandene künstliche Anabiose der Spermien rein mechanisch durch auftretende Wirbelströme und Schlierenbildung gestört. In sehr geringem Maße können auch bereits kleinere Temperaturschwankungen für die Spermaschädigung mit verantwortlich gemacht werden.

**Zusammenfassung der Versuchsergebnisse zur
Glycerinverträglichkeit**

Das Optimum der Glycerinverträglichkeit des Spermas lag zwischen 8 und 10%. Konzentrationen, die über 10% hinausreichten, erwiesen sich als nachteilig. Eine Unterschreitung der 8%-Grenze konnte als nicht so ungünstig erachtet werden. Der sofortige Zusatz des glycerinhaltigen Verdünners erwies sich günstiger als die Behandlung des Samens mit einem Vor- und Nachverdünner; desgleichen hatte die fraktionierte Zufügung des Glycerins eine ungünstige Wirkung auf die Lebensdauer und die Lebensintensität der Spermien. Der unmittelbar nach der Gewinnung unfraktioniert erfolgende Zusatz eines 9% glycerinhaltigen Verdünners erwies sich demnach als die für Schweinesperma geeignete Methode, den Samen für die Tiefkühlung zu präparieren.

Methodik der Tiefkühlung

Fraktionierter Glycerinzusatz

Während die vorhergehenden Versuche alle bei Kühlschranktemperatur ($+5^{\circ}\text{C}$) durchgeführt wurden, kam es im folgenden auf die Erprobung der gesammelten Erfahrungen bei der Tiefgefrierung an. Zunächst wurde die bei Glycerinverträglichkeit des Schweinespermas gemachte Feststellung, daß es vorteilhafter sei, das Glycerin zu dem Samen sofort und auf einmal zuzugeben,

hinsichtlich der Tiefgefrierung überprüft. Untersucht wurden 30 Ejakulate in 4 Gruppen.

1. Glycerinzusatz sofort und auf einmal bei $+ 25^{\circ} \text{C}$
2. Glycerinzusatz nach 3 Stunden, auf einmal bei $+ 5^{\circ} \text{C}$
3. Glycerinzusatz in Fraktionen bei $+ 25^{\circ} \text{C}$
4. Glycerinzusatz nach 3 Stunden in Fraktionen bei $+ 5^{\circ} \text{C}$.

Verdünnt wurde im Verhältnis 1 : 3 mit dem 9% Glycerin enthaltenden Glukose-Dotter-Verdünner. Die Kühlung des Samens der Versuchsgruppe Nr. 1 auf -79°C wurde nach Abkühlung im Kühlschrank auf $+ 5^{\circ} \text{C}$ bei einer Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ} \text{C}/2 \text{ min.}$ vorgenommen. Der Samen der Versuchsreihen 2, 3 und 4 wurde 40 min. nach beendetem Glycerinzusatz tiefgekühlt. Die Kühlgeschwindigkeit betrug von $+ 5^{\circ} \text{C}$ bis -79°C $1^{\circ} \text{C}/\text{min.}$

Die Tiefkühlung erfolgte in einem Thermosbehälter im Alkoholbad unter Hinzufügen von Trockeneis. Zur weitgehenden Vermeidung technischer Mängel wurde auf ein angefärbtes Kühlmedium größten Wert gelegt; z. B. um die Dichtigkeit der Reaktionsgefäße zu gewährleisten.

Das Auftauen des Gefriersamens erfolgte bis der Eiskern sich von der Wand löste, in Eiswasser bei $+ 4^{\circ} \text{C}$, dann wurden die Proben in der Hand, bis zur Erreichung des völlig flüssigen Aggregatzustandes, erwärmt. Die mikroskopische Untersuchung geschah auf einem Heiztisch bei 38°C . Eine Übersicht der Ergebnisse in den vier verschiedenen Gruppen gibt folgende Tabelle.

Tabelle 13
Vorwärtsbewegung der nach 4 verschiedenen Methoden
eingefrorenen Spermien nach dem Auftauen

Glycerinzusatz	Vorwärtsbewegung in %	
	maximale	durchschnittliche
Gruppe 1		
sofort, auf einmal	30	22,3
Gruppe 2		
nach 3 Stunden auf einmal	20	17,1
Gruppe 3		
sofort, in Fraktionen	20	15,2
Gruppe 4		
nach 3 Stunden in Fraktionen	15	11,0

Aus der Aufstellung ergibt sich, daß sich bei dem Einfrieren des Spermias der sofortige, gesamte Zusatz des glycerinhaltigen Verdünners am besten bewährt.

Adaptionszeit

Hinsichtlich der Einhaltung einer Adaptionszeit für die Tiefkühlung des Eberspermas wurden 18 Ejakulate untersucht, die jeweils

1. sofort nach der Verdünnung (keine Adaptionszeit)
2. nach einer Adaptionszeit von 3 Stunden
3. nach einer Adaptionszeit von 6 Stunden
4. nach einer Adaptionszeit von 9 Stunden
5. nach einer Adaptionszeit von 12 Stunden eingefroren wurden.

Dabei fand der Glukose-Dotter-Verdünnser mit 9%igem Glycerinzusatz Verwendung. Das Verdünnungsverhältnis betrug 1 : 3. Der Zusatz erfolgte gleich nach der Spermagewinnung, nach einer Temperaturangleichung von 25° C. Die Kühlgeschwindigkeit betrug 1° C/min. Auftauen und Untersuchung der Spermien wurde wie vordem beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 14

**Vorwärtsbewegung der nach verschiedenen
Adaptionszeiten eingefrorenen Spermien nach dem Auftauen**

Adaptionszeit	Vorwärtsbewegung in %	
	maximale	durchschnittliche
Keine	35	23,0
3 Stunden	30	18,6
6 Stunden	25	15,2
9 Stunden	25	15,5
12 Stunden	20	12,4

Aus der Tabelle resultiert eine Überlegenheit der Methode des sofortigen Einfrierens ohne Einhaltung einer Adaptionszeit. Es liegt daher die Annahme nahe, daß die Spermatozoen des Ebers die Einwirkung der Tiefkühlung desto besser überstehen, je weniger Lebensenergie sie während der Adaptionszeit verbrauchen. Der Energiereichtum der Spermien wäre demnach der Widerstandsfähigkeit gegenüber den schädigenden Einflüssen der Tiefkühlung direkt proportional. Für Schweinesperma ist es daher von Vorteil, keine Adaptionszeit einzuhalten.

Kühlgeschwindigkeit

Zur Ermittlung der optimalen Kühlgeschwindigkeit wurden 29 Ejakulate in 4 Vergleichsgruppen geprüft. In der

1. Gruppe erfolgte die Abkühlung von $+5$ auf -79° um $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$,
2. Gruppe erfolgte die Abkühlung von $+5$ auf -79° um $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$,
3. Gruppe erfolgte die Abkühlung von $+5$ auf -20° um $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, dann anschließende Sturzkühlung. In der
4. Gruppe Sturzkühlung von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C .

Tabelle 15

**Vorwärtsbewegung der unter verschiedener
Kühlgeschwindigkeit eingefrorenen Spermien nach dem Auftauen.**

Kühlgeschwindigkeit	Vorwärtsbewegung in %	
	maximale	durchschnittliche
Gruppe 1 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.	35	23,3
Gruppe 2 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.	25	10,2
Gruppe 3 bis -20° $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. dann Sturzkühlung	30	19,2
Gruppe 4 Sturzkühlung	10	5,2

Es zeigte sich, daß die Kühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute im Bereich von 5°C bis -79°C allen anderen Verfahren überlegen war. An nächster Stelle steht das Verfahren in Gruppe 3, d. h. bis Abkühlung um $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ und dann Sturzkühlung bis -79°C . Die Sturzkühlung von $+5^{\circ}\text{C}$ auf -79°C hatte die unbefriedigendsten Ergebnisse aufzuweisen. Die Spermien waren bei diesem Verfahren nach dem Auftauen häufig agglutiniert.

Zentrifugieren des Spermas.

Da Ebersperma eine starke Beimengung von Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen enthält, sollte im folgenden überprüft werden, ob diese auf die Tiefkühlfähigkeit des Samens einen Einfluß haben. Es kamen 36 Ejakulate zur Untersuchung. Sofort nach der fraktionierten Absamung wurde das Ejakulat der 1. und 2. Hauptphase bei 3200 Umdrehungen pro Minute 1 min. lang zentrifugiert. Das über der kompakten Spermamasse befindliche Plasma wurde dekantiert. Anschließend an die Temperaturangleichung auf $+25^{\circ}\text{C}$ erfolgte die Verdünnung der Spermien in der Weise, daß die entfernte Plasmaflüssigkeit durch das gleiche Volumen an Verdünner ersetzt wurde. Dadurch besaß der nunmehr verdünnte Samen annähernd dieselbe Dichte, wie vorher das unver-

dünnte Ejakulat. Dies entspricht einem Verdünnungsverhältnis des zentrifugierten Spermas von 1 : 8. Vorausgesetzt, daß die Eber ein normal dichtes Sperma ejakulierten. Das zentrifugierte Sperma wurde sofort und auf einmal mit dem glycerinhaltigen Verdünner für die Tiefgefrierung präpariert. Die Einhaltung einer Adaptionzeit empfahl sich nicht.

Tabelle 16

Vorwärtsbewegung zentrifugierter Spermien nach dem Auftauen im Gegensatz zu nicht zentrifugierten.

	Vorwärtsbewegung in %	
	maximale	durchschnittliche
nicht zentrifugiert	35	32,0
zentrifugiert	50	39,9

Die Versuche ergaben einen günstigen Einfluß des Ersatzes des Samenplasmas durch glycerinhaltigen Verdünner. Eine Schädigung der Spermien durch das Zentrifugieren konnte nicht beobachtet werden.

Tabelle 17

Vorkommen folgender Prozentsätze an Vorwärtsbewegung nach dem Auftauen bei 36 Versuchen als Maximal.

	50	45	40	35	30
Sperma zentrifugiert	5 x	7 x	8 x	6 x	6 x
Sperma nicht zentrifugiert	—	—	—	4 x	6 x

Verdünner.

Zur Austestung der in vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Verdünner, Glukose-Dotter, Magermilch-Dotter und Magermilch allein, wurden Versuche an 20 Ejakulaten durchgeführt. Das Sperma wurde zentrifugiert sowie nicht zentrifugiert, mit und ohne Glycerinzusatz tiefgefroren.

Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle.

Tabelle 18

Vorwärtsbewegung der in verschiedenen Verdünnern eingefrorenen und wieder aufgetauten Spermien.

		Vorwärtsbewegung in %	
Verdünner		maximale	durchschnittliche
Sperma zentrifugiert	Glukose-Dotter + 9% Glycerin	50	35,4
	Magermilch-Dotter + 9% Glycerin	40	27,3
	Magermilch + 9% Glycerin	35	24,8
Sperma nicht zentrifugiert	Glukose-Dotter + 9% Glycerin	35	23,2
	Magermilch-Dotter + 9% Glycerin	20	10,4
	Magermilch + 9% Glycerin	20	10,3
ohne Glycerin	Glukose-Dotter	0	0
	Magermilch-Dotter	0	0
	Magermilch	0	0
Sperma und Glycerinzusatz von 1% bis 10%		0	0

Aus voriger Übersicht geht hervor, daß zentrifugiertes Sperma die Tiefkühlung besser überstand als nicht zentrifugiertes.

Der Glukose-Dotter-Verdünner war allen anderen Verdünnern überlegen.

Der darauf nächstfolgende ist der Magermilch-Dotter-Verdünner.

Das Tiefkühlen von Schweinesperma ohne Glycerinzusatz erwies sich als ungangbar. Desgleichen das Einfrieren von Sperma mit Glycerinanteil ohne sonstiges Konservierungsmittel. Die frostschützende Wirkung des Glycerins setzt demnach erst dann ein, wenn das Glycerin in einem ganz bestimmten Verhältnis an andere Medien gekoppelt ist. Der Grund mag darin liegen, daß die spermatotoxische Eigenschaft des reinen Glycerins durch entsprechende Verdüner ab-

geschwächt wird, fehlen diese, so addieren sich die schädigenden Einflüsse der Tiefkühlung zu denen des Glycerins und die Spermien sterben ab. Tiefkühlversuche mit Citratverdünnern verliefen ebenfalls negativ.

Auftauen.

Die gleichen Konzentrationsschwankungen, welche das Sperma während des Einfrierens gefährden, treten auch beim Auftauen auf. Daher ist dieser Punkt letzten Endes ausschlaggebend für die Lebenderhaltung der Spermien. Wenn die Spermatozoen die Tiefkühlung gut überstanden haben, so kann ein falsches Auftauen alles zunichte machen. Für das Schweinesperma wurden die 3 folgenden Methoden an 8 Ejakulaten untersucht.

1. Auftauen im Wasserbad bei $+ 38^{\circ} \text{C}$
2. Auftauen in Eiswasser bei $+ 4^{\circ} \text{C}$
3. Auftauen in Eiswasser bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ bis sich der Eiskern von der Glaswand löst, dann völliges Auftauen bei $+ 38^{\circ} \text{C}$.

Die unter Ziffer 3 angeführte Methode erwies sich als die beste und wurde bei allen Versuchen weitgehend angewandt.

Die maximale Lebensdauer der Samenzellen nach dem Auftauen betrug 36 Stunden, umgerechnet auf den Durchschnitt ergab sich ein Wert von 24 Stunden. In vereinzelten Fällen zeigten die Spermien nach dem Auftauen keine Lebensäußerungen mehr. Dies muß einer besonderen Gegebenheit des Eber-ejakulates eigen sein, weil andere Ejakulate desselben Tieres zu einem anderen Zeitpunkt die Tiefkühlung gut überstanden hat und die Bedingungen des technisch einwandfreien sowie sterilen Arbeitens stets gleich waren.

Befruchtungsfähigkeit.

Zur Überprüfung, ob tiefgefrorener Ebersamen seine Befruchtungsfähigkeit beibehält wurden 11 Sauen mit zentrifugiertem, im Glukose-Dotter-Glycerin-gemisch tiefgefrorenen Sperma besamt.

Davon wurde eine nachweisbar trächtig. Eine rauschte 7 Wochen nach der Samenübertragung außerhalb des Zyklus nach. Der Verdacht des Verwerfens konnte nicht einwandfrei bestätigt werden. Die restlichen 9 Sauen rauschten bei der nächsten Brunstperiode nach.

Überblick über die Tiefkühlversuche.

Das Zufügen von Glycerin soll auf einmal und sofort in der vollen entsprechenden Konzentration geschehen. Es findet nach der Samengewinnung im Wasserbad bei $+ 25^{\circ} \text{C}$ statt, sobald die Temperaturangleichung erreicht ist. —

Das Einhalten einer Adaptionszeit empfiehlt sich nicht. Das Überleben der Spermien nach der Tiefkühlung ist besser, wenn der präparierte Samen sobald er $+ 5^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank erreicht hat eingefroren wird. Bei der Einhaltung einer Adaptionszeit sinkt die Überlebensrate der Spermatozoen.

Die Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erscheint als günstigstes Verfahren. Die Sturzkühlung ist nicht geeignet. Das Auftauen geschieht am günstigsten im Eiswasser bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ bis der Eiskern sich von der Wand löst, dann folgt völliges Auftauen im Wasserbad bei $+ 38^{\circ}\text{C}$.

Verfährt man nach dieser Methode, so zeigt die Färbung der aufgetauten Spermien mit Eosin eine durchschnittliche Überlebensrate von 40%, die meiner Ansicht nach zur Befruchtung ausreicht.

Zentrifugiertes Ebersperma überlebt die Tiefkühlung wesentlich besser als solches, das die Zumischung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen besitzt.

Die Überlebensfähigkeit der Spermien verschiedener Ejakulate ein und desselben Ebers in Bezug auf die Tiefkühlung ist großen Schwankungen unterworfen, und hat seinen Ursprung in der individuellen Eigenart des einzelnen Ejakulates. Die Befruchtungsfähigkeit tiefgefrorenen Ebersamens ist bewiesen.

Übersicht über die Versuchsergebnisse

Es wurden Versuche durchgeführt, die auf eine erfolgreiche Tiefkühlung des Eberspermas abgezielt waren. Dazu wurden zunächst einige Verdünner auf ihre Spermaverträglichkeit überprüft und die dabei als besonders geeignet befundenen den weiteren Versuchen zur Austestung für Tiefkühlung herangezogen.

Das Sperma wurde mit einer modifizierten Rinderscheide fraktioniert gewonnen. Zur Tiefkühlung wurde nur die Hauptfraktion des Eberejakulates ohne Anteil des Bulbourethraldrüsensekretes benutzt. Die Verdünnung des Spermas erfolgte im Verhältnis 1 : 3 sofort nach der Samenentnahme. Die Temperaturangleiche wurden im Wasserbad bei $+ 25^{\circ}\text{C}$ vollzogen.

Nach der Verdünnung wurden die Spermaproben im Eisschrank um $1^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$ bis $+ 5^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und dort aufbewahrt.

Als am besten geeigneter Verdünner erwies sich ein Eidotter-Glukose-Gemisch bestehend aus 3,5 Glukose, 25,0 Eidotter ad 100,0 Aq. bidest.

Ein Magermilch-Dotter-Verdünner bestehend aus 10 g Magermilchpulver, Aqua bidest ad 100,0 ml, Dotter 25,0 bewährte sich gleichfalls, jedoch nicht so gut wie das Eidotter-Glukose-Gemisch. Die maximale Lebensdauer der Spermien betrug mit dem besten Verdünner 240 Stunden im Maximum, durchschnittlich 190 Stunden.

Die Glycerinverträglichkeit des Eberspermas hat kein ausgeprägtes Optimum, die Grenze der günstigsten Wirksamkeit liegt zwischen 8% und 10% Glycerinanteil.

Konzentrationen über 10% Glycerin erwiesen sich als nachteilig. Der sofortige Zusatz des glycerinhaltigen Verdünners war der Arbeitsweise mit einem Vor- und Nachverdünner überlegen. Eine fraktionierte Zugabe des Glycerins war nachteilig. Die Einhaltung einer Adaptionszeit ist ungünstig für die Tiefkühlung von Ebersperma und es empfiehlt sich, das Sperma nach Abkühlung auf $+5^{\circ}\text{C}$ sofort einzufrieren.

Hierbei zeigte eine Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ die besten Resultate. Das nächstbeste Verfahren ist die Abkühlung um $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -20°C , worauf Sturzkühlung bis -79°C folgt.

Das Auftauen erfolgte am vorteilhaftesten in bezug auf die Überlebensrate der Spermien in der Weise, daß die Proben in Eiswasser von $+4^{\circ}\text{C}$ gebracht werden, bis sich der Eiskern von der Glaswand löst, worauf das endgültige Auftauen im Wasserbad bei 38°C geschieht.

Zentrifugierte Eberspermatozoen überstanden die Tiefkühlung besser als unzentrifugierte. Die durchschnittliche prozentuale Vorwärtsbewegung nach dem Auftauen betrug bei zentrifugiertem Sperma 35,4%, bei nichtzentrifugiertem 23,2%. Der Eidotter-Glukose-Verdünner war bei der Tiefkühlung allen anderen Konservierungsmitteln überlegen. Am günstigsten ist ein Glycerinanteil von 9%. Um die Befruchtungsfähigkeit tiefgeköhlten Ebersamens zu erweisen, wurden 11 Sauen am zweiten Tag der Rausche mit 150 ml tiefgefrorener Samenflüssigkeit besamt. 9 Tiere rauschten nach.

Bis jetzt ist es jedoch geglückt, bei einem Mutterschwein mittels dieser Methode eine Trächtigkeit zu erzeugen. Dieses Tier hat inzwischen 9 sehr lebensfähige Ferkel geboren.

Zusammenfassung

1. Der Eidotter-Glukose-Verdünnner erbrachte die optimalste konservierende Wirkung auf Schweinesperma.
2. Die günstigste Glycerinkonzentration beträgt 9%. Der glycerinhaltige Verdünnner wird nach der Spermagewinnung sofort und auf einmal zugefügt.
3. Eine Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erwies sich als vorteilhafteste.
4. Zentrifugiertes Ebersperma übersteht die Tiefkühlung besser als unzentrifugiertes.
5. Die Eignung des Eberspermas zur Tiefkühlkonservierung unterliegt großen individuellen Schwankungen sowohl im Vergleich des einzelnen Ejakulats eines Spenders untereinander, wie auch im Vergleich zu verschiedenen Ejakulaten verschiedener Eber. Daraus resultiert, daß bei gleicher Methodik sehr unterschiedliche Resultate auch bezüglich Lebens- und Befruchtungsfähigkeit zu erwarten sind.
6. Mittels geschilderter Methode ist Ebersperma durch Tiefkühlung in ca. 80% der Fälle lebensfähig zu erhalten.
7. Die Befruchtungsfähigkeit von Tiefkühlsperma des Schweines ist durch einen erzeugten gesunden Wurf von Ferkeln bestätigt.

Summary

1. The Egg-Yolk-Glucose-Dilution had the most efficient effect on boar-semen.
2. The most effectfull glycerol concentration is 9%. The glycerol containing diluent is added after spermcollection at once and at one part.
3. Temperature-diminution for 1°C . per minute was the best way in deep-freezing.
4. Boar-semen, which is centrifugated shows better survivingrates after deep-freezing, than boar-sperm which has not been centrifugated.
5. The ability of boar-semen to withstand deep-freezing is not always the same. There are differences as well in the ejaculates of the same boar as in such of a series of boars. Resulting of that fact there may be differences in the surviving-rate and the security of conception.
6. Working in such manner of deep-freezing, boar-semen will be kept livable at about 80%.
7. Untill now one litter of healthy piglets was gained by deep-frozen boar-semen.

Literatur-Verzeichnis

- (1) Bahlau, E. (1958):
Untersuchungen über die Konservierung von Hundesperma. Vet. Diss. München.
- (2) Baier, W.; Grauvogl, A. (1959):
Samenentnahme beim Eber in der tierärztlichen Praxis.
B. M. T. W. 72 Jg. Heft 8. 150 — 152.
- (3) Bonnadonna, T. (1938):
Ricerche sulla fecondazione artificiale degli animali domestici.
Esperimenti orientativi di fecondazione artificiale nei suine. (Suini. Terza serie sperimentale)
Fecondazione artific. d. animali domestici.
(Sonderbeilage der Clin. vet. **61** 1, 19 — 28.
- (4) Bonnadonna, T. (1940):
Manuale de tecnica della Fecondazione Artificiale degli Animali.
Artigrafische A. Milesi e. Figli.
Milano XIX, 789 F.
- (5) Du Mesnil, Du Buisson, F. (1957):
Conservation du Sperme de Verrat sans Dilution: Condition d'Examen.
Extrait, Ann. Zootech. Paris, Nr. 4. Pages 391 — 399.
- (6) Dziuk, P. J.; Graham, E. F.; Donker, J. D.; Marion, G. B.;
Petersen, W. E. (1954):
Some Observations in Collecting of Semen from Bulls, Goats, Boars, and Rams by Electrical Stimulation.
Vet. Med. **49**, 455 — 458.
- (7) Eibl, K.; Urbaschek, B.; Zoder, H. F. (1954):
Tiefkühlkonservierung des Bullenspermas. Fortpfl. Zuchthyg. u. Haustierbes.
4. Jahrg. Heft 5.
- (8) Glover, T. D. (1955):
The Semen of the Pigs.
Vet. Rec. **67**, 36 — 40.
- (9) Götz, R. (1949):
Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere. Verlag Schaper.
- (10) Hahn, J. (1958):
Zur Samenentnahme beim Eber.
Zuchthyg., Fortpflanzungsstörungen und Besamung d. Haustiere. II. **2**;
71 — 75.

- (11) Ha a r o p, A. E. (1956):
Artificial Insemination in Dogs.
Brit. Vet. Journ. **112**, 338 — 340.
- (12) H o l t, A. F. (1953):
The Effect of Glycerolisation of Bull Semen on Fertility. Vet. Rec. **65** Nr. 39.
- (13) I f o, S.; N i w a, T.; K u d o, A. (1951):
Studies on Artificial Insemination in Pigs. I. In the Method of Collecting of Semen and the Condition of Ejaculation.
Bull. Zoo techn. Exp. Sta. Nr. 55.
Ref. in Animal Breeding Abstr. **19**/223.
- (14) I f o, S.; N i w a, T.; K u d o, A.; M i z u h o, A. (1951):
Studies on Artificial Insemination in Pigs. II. Observations on the Semen and Storage.
Res. Bull Zootechn. Exp. Sta. No. 55.
Ref. in Animal Breeding Abstr. **19**. 223 — 224.
- (15) K e r r u i s h, D. W. (1956):
A Field Trial Comparision of Milk an Egg — Yolk — Citrate as Semen Dilutors.
Illrd. Int. Congr. Animal Reprod. Cambridge. Plenary Papers 65 — 68.
- (16) L a m b e r t, L.; M c K e n n z i e, F. F. (1940):
Artificial Insemination in Livestockbreeding.
United States Department of Agriculture, Circular No. 567, Washington, revised by A. H. Frank 1952.
- (17) L i e b e n b e r g, O. (1952):
Die Besamung der Haustiere, insbes. des Rindes.
Neumann-Verlag, Radebeul u. Berlin.
- (18) L i n d a h l, P. E.; K i h l s t r ö m, I. E. (1954):
An Antiagglutinic Factor in Mammalian Sperm. Plasm.
Fertility and Sterility **5**, 241 — 254.
- (19) M a n n, T. (1954): The Biochemistry of Semen.
Verlag Methuen u. Co. LTD. London u. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- (20) M c K e n z i e, F. F. (1931):
A Method for the Collection of Boar Semen.
Amer. Vet. Med. Assoc. **78**, 244 — 246.
- (21) M c K e n z i e, F. F.; M i l l e r, J. C.; B a u g u e s s, L. C. (1938):
The Reproductive Organs and Semen of the Boar.
Miss Agric.
Exp. Sta. and Bureau of Animal Industry, Columbia, Missouri, Res. Bull **279**.

- (22) Milowanow, V. K. (1940):
Die künstliche Besamung der Haustiere. 5. Aufl. Moskau.
- (23) Noll, D. O. (1949):
Studies on Longevity of the Sperm of the Boar.
Philippine J. Animal Industry, 10, 247 — 259.
- (24) Olbrycht, T. (1938):
Die künstliche Besamung der Haustiere.
Tierärztl. Mitteilung 19, 971 — 976.
- (25) Parkes, A. S. (1956):
Preservation of Living Cells and Tissues at Low Temperatures.
IIIrd. Int. Congr. Animal Reprod. Cambridge, Plenary Papers pp. 69 — 75.
- (26) Perry, E. J. (1955):
The Artificial Insemination of Farm Animals.
Rutgers University Press, New Brunswick.
- (27) Polge, C.; Parkes, A. S. (1952):
Possibilities of Long Term storage of Spermatozoa at Low Temperatures.
Animal Breeding Absfr. 20, 1 — 4.
- (28) Polge, C. (1953):
The Storage of Bull Semen at Low Temperatures.
Vet. Rec. 65. No. 35.
- (29) Polge, C.; Rowson, L. E. A.; Stower, S.; Holt, I.; Bruce, R. L.;
Swanney, M. R. F.; Moss, St. (1953):
Symposium: Society for the Study of Animal Breeding.
Febr. 6th 1953, Vet. Rec. 65.
- (30) Polge, C.; Rowson, L. E. A. (1953):
Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79°C .
Nature, London 169, 627 — 627.
- (31) Polge, C. (1916):
Artificial Insemination in Pigs.
Vet. Rec. 68, 62 — 76.
- (32) Rodolfo, A. (1934):
The Physiology of Reproduction in Swine. I. The Semen of Boars under
different Intensiviness of Mating.
Philipp. Journ. Sci. 53, 183 — 203.
- (33) Rowson, L. E. A. (1956):
Artificial Insemination in Pigs.
Agriculture, No. 12, 571 — 573, London.

- (34) Rowson, L. E. A. (1956):
The Low Temperature of Germinal Cells.
Illrd. Int. Congr. Animal Reprod. Cambridge, Plenary Papers 69 — 75.
- (35) Rowson, L. E. A.; Polge, C (1953):
Storage of Bull Semen at — 79° C and Fertility Results for up to 12 Months.
Vet. Rec. 65, No. 43.
- (36) Roy, A. (1955):
Storage of Boar and Stallion Spermatozoa in Glycine-Egg-Yolk-Medium.
Vet. Rec. 67, 330 — 331.
- (37) Salisbury, G. W.; Van de Mark, R. (1945):
Stimulation of Livability and Glykolysis by Additions of Glucose to the
Egg-Yolk-Citrate Diluent for Ejaculated Bovine Semen.
Americ. J. Physiol. 143 (5), 692 — 697.
- (38) Sherman, J. K. (1954):
Freezing and Freeze-Drying of Human Spermatozoa.
Fertility and Sterility 5, 357 — 371.
- (39) Van Dieten, S. W. J.:
Konservierung und Kühlung des Spermas.
Fortpflanzung, Zuchthyg. und Haustierbesamung. 4. Jhrg., Heft 12, 1954.

LEBENS LAUF

Als Sohn des Tierarztes Dr. Herbert Hoffmann und seiner Ehefrau Charlotte Hoffmann, geb. Richter, wurde ich, Hans Herbert Hoffmann, am 17. Januar 1932 in Dessau/Anhalt geboren. Dort besuchte ich von 1939 bis 1943 die Volksschule und von 1943 — 1945 die Goethe-Oberrealschule. Von 1945 — 1948 war ich Schüler des Dom-Gymnasiums in Freising, 1948 — 1952 besuchte ich das Alte Real-Gymnasium in München, das ich im Juni 1952 mit dem Reifezeugnis verließ. Im Wintersemester 1952/53 wurde ich zum Studium an der tierärztlichen Fakultät der Universität München zugelassen. Nach dem Wintersemester 1956/57 unterzog ich mich der tierärztlichen Prüfung, die ich im Juli 1957 beendete. Die Approbation erhielt ich im April 1958. Seit Juni 1958 bin ich an der Besamungsaußenstelle der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München tätig.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. B a i e r, sage ich meinen Dank für die Anregung zu diesem Thema und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Desgleichen danke ich Herrn Privatdozenten Dr. L e i d l für manche wertvolle Anregung.

